

09,398,365

Insuline

DERWENT-ACC-NO: 1989-343268  
DERWENT-WEEK: 198947  
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Insulin derivs. useful as antidiabetic drugs - in which fatty acids are bonded to amino gps. of B1 and/or B29-amino-acids in B-chain of insulin

PATENT-ASSIGNEE: KODAMA KK[KODAN]

PRIORITY-DATA: 1988JP-0083912 (April 5, 1988)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
JP 01254699 A	October 11, 1989	N/A
N/A		005

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP01254699A	N/A	1988JP-0083912
April 5, 1988		

INT-CL\_(IPC): A61K037/26; C07K007/40 ; C07K099/26

ABSTRACTED-PUB-NO: JP01254699A

BASIC-ABSTRACT: Fatty acids are bonded to amino gps. of B1- and/or B29-amino acids in B chain of insulin. Drug compns. as antidiabetic drugs contain pharmacologically permitted amts. of the insulin derivs. as active components.

As insulin, any type of insulin (human, swine, etc.) can be used. As fatty acids, C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> fatty acids are preferred, esp. palmitic acid. The synthetic processes are (i) synthesis for activated ester of fatty acid, (ii) formation of p-methoxybenzoyl carbonyl-activated (pMOC) insulin (pMOC-insulin), (iii) addition of fatty acid to pMOC-insulin, (iv) removal of pMOC group.

esp. deaminated  
pal-insulin pal-1, pal-2' are effective. They are useful as  
antidiabetic  
drugs.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

INSULIN DERIVATIVE USEFUL ANTIDIABETIC DRUG FATTY ACID BOND AMINO  
GROUP AMINO  
ACID CHAIN INSULIN

DERWENT-CLASS: B04

CPI-CODES: B04-B04D2; B12-H05;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

F012 F014 F423 F521 G010 G013 G100 H1 H100 H181  
H182 H4 H401 H441 H481 H8 J0 J011 J012 J1  
J111 J171 J172 J3 J371 K0 K2 K224 L2 L250  
M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232 M233  
M262 M280 M281 M311 M312 M313 M314 M315 M320 M321  
M322 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381  
M391 M392 M423 M510 M520 M521 M530 M531 M540 M620  
M781 M903 P816 V621 V902 V917 V922

Registry Numbers

1704X 1724X 1711X 1714X 89290 13270 05020

SECONDARY-ACC-NUM:

CPI Secondary Accession Numbers: C1989-152047

CLIPPEDIMAGE= JP401254699A  
PAT-NO: JP401254699A  
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 01254699 A  
TITLE: INSULIN DERIVATIVE AND USE THEREOF

PUBN-DATE: October 11, 1989

INVENTOR-INFORMATION:

NAME  
MURANISHI, SHOZO  
KISO, YOSHIAKI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KODAMA KK	N/A

APPL-NO: JP63833912  
APPL-DATE: April 5, 1988

INT-CL\_(IPC): C07K007/40; A61K037/26

ABSTRACT:

NEW MATERIAL: An insulin derivative having a fatty acid linked to amino group of an amino acid of B<SB>1</SB> or B<SB>29</SB> in insulin B chain expressed by the formula (R<SB>1</SB> and R<SB>2</SB> are fatty acid group; X and Y are threonine or alanine; Z is isoleucine or valine).

USE: A hyperglycemic agent, excellent in stability, having fat solubility and useful for diabetes.

PREPARATION: For example, a fatty acid e.g., palmitic acid is reacted with N-hydroxybenzotriazole in a solvent to provide a fatty acid N-hydroxybenzotriazole ester, which is then mixed with a solution of p-methoxycarbonyl-protected bovine insulin and reacted at ambient temperature for 3hr. After completing the reaction, the solvent is distilled away and the residue is purified.

purification by gel filtration and high-speed chromatography,  
etc., to afford  
the aimed compound expressed by the formula.

COPYRIGHT: © 1989, JPO&Japic

*Insulin Der.*

(19) Japanese Patent Office (JP)

(11) Laid-open patent application

(12) **Laid-open Patent Gazette** (A) **Hei 1-254699**

(51)Int.Cl<sup>4</sup> Identification symbol Internal reference No.

(43)Laid-open 11 October 1989

C07K 7/40

8318-4H

A61K 37/26

ADP

8615-4C

//C07K 99:26

Request for examination: not requested

Number of claims: 5 (Totally 5 pages)

(54) Title of invention: Insulin derivative and its application.

(21) Appl. No. Sho 63-83912

(22) Appl. date 5 April 1988

(72) Inventor Muranishi

(72) Inventor Kiso

(71) Applicant Kodama Co., Ltd.

(74) Representative Patent attorney [reading of name uncertain], 2 others

## SPECIFICATION

### 1. TITLE

Insulin derivative and its application.

### 2. CLAIMS

(1) An insulin wherein a fatty acid is bound to the amino group of amino acid B<sub>1</sub> or B<sub>29</sub> of the insulin B chain.

(2) An insulin wherein a fatty acid is bound to the amino group of amino acids B<sub>1</sub> and B<sub>29</sub> of the insulin B chain.

(3) A pharmaceutical composition having a pharmacologically acceptable amount of the compound described in claim 1 as the effective component.

(4) A pharmaceutical composition having a pharmacologically acceptable amount of the compound described in claim 2 as the effective component.

(5) A pharmaceutical composition described in any of claims 3 and 4 which is

### 3. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

#### Technical field

This invention relates to a novel insulin derivative, more particularly to an insulin derivative which is useful for lowering the blood sugar in diabetes.

#### Background art

Insulin is a peptide consisting of 51 amino acid residues which is secreted from the Langerhans islets of the pancreas; it controls the glucose amount in the blood. If for any reason control of the secretion of insulin from the pancreas becomes abnormal, high blood sugar symptom occurs and diabetes develops. If a diabetic patient is left to himself, various symptoms develop from the high blood sugar condition and death can usually not be avoided. In order to normalize this high blood-sugar condition, it is necessary to administer insulin. The insulin used can be extracted and purified from bovine and porcine pancreas, or it can be the human type made by recombinant genes in bacteria, or it can be porcine insulin enzymatically converted to the human type.

The difference between human insulin and bovine or porcine insulin in the below formula (I) is that, in bovine insulin the amino acids 8 and 10 of the A chain ( $A_8$  and  $A_{10}$ ) are alanine and valine and amino acid 30 of the B chain ( $B_{30}$ ) is alanine, in porcine insulin amino acid 30 of the B chain is alanine and amino acids 8 and 10 of the A chain are threonine and isoleucine, and in human insulin amino acids 8 and 10 of the A chain are threonine and isoleucine and amino acid 30 of the B chain is threonine.

Such human, porcine or bovine insulin is administered to the patient as an injection agent in the necessary amount subcutaneously or intramuscularly, to control the blood sugar.

Diabetic patients must inject insulin every day for their entire lives, and many suffer problems such as pain while injecting or degeneration in the area of injection.

In order to avoid such pain accompanying the injection,

insulin is administered together with the insulin promoting operations containing insulin together with, e.g., absorption promoters and protease inhibitors. Examples

include a method incorporating an enzyme inhibitor (Danforth et al.: Endocrinology **65**, 175, 1978), a method using an oil emulsion with an emulsifier (Nanari (?) et al., Acta Diabet.Lab. **15**, 175, 1978), a method using ribosomes (Yoshida: EPA 140,085), and a method wherein insulin particles are entrapped in an azo polymer and released in the large intestine where no digestive enzymes are secreted (M.Saffran: Canadian J.Biochem., **57**, 548, 1979).

Also, glycosylated insulin is known as insulin for transdermal use (US patents 4,478,830, 4,478,746, 4,483,792, 4,489,063, 4,489,064 and 4,536,572). These various glycosylated insulins are used because conventional insulin forms crystals, and is therefore not stable during long-term storage.

#### **Problem(s) to be overcome by the invention**

It is the object of this invention to provide an insulin derivative suited as a pharmacologically acceptable, stable insulin preparation.

#### **Means of overcoming the problem(s)**

As a result, the present inventors discovered a novel fatty acylated insulin as a fat-soluble insulin which does not lose its insulin activity and shows the effect of lowering the blood sugar, and they thus completed this invention.

The novel insulin derivative of this invention is represented by general formula (I):

[see formula at the lower left corner of page 796 of the original]

(in the formula,  $R_1$  and  $R_2$  represent the same or different fatty acyl groups, X and Y both represent threonine or alanine, Z represents isoleucine when X and Y are threonine, and valine when X and Y are alanine.

Further, in the formula Phe represents phenylalanine, Ile isoleucine, Val valine, Glu glutamic acid, Gln glutamine, Cys cysteine, Ser serine, Thr threonine, and

The compounds of this invention are useful as agents for lowering the blood sugar in diabetes.

As shown in the above general formula (I), the fatty acylated insulin of this invention has a fatty acid attached to one or both amino acids B<sub>1</sub> and B<sub>29</sub> in the insulin B chain.

In this invention, human, porcine or bovine insulin may be used.

The fatty acid bound to insulin in this invention is preferably one with about 7-21 carbon atoms; examples are caprylic acid, pelargonic acid, capric acid, undecanoic acid, lauric acid, tridecanoic acid, myristic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, heptadecanoic acid, stearic acid, nonadecanoic acid, phlathic (?) acid, undecenoic acid, oleic acid, elaidic acid, cetoleic (?) acid, elcanic (?) acid, placidic (?) acid, sorbic acid, and linoleic acid. Palmitic acid is particularly preferred.

The compounds of this invention can, e.g., be produced by the following method.

Step (1): Synthesis of an activated ester of fatty acid.

Step (2): p-methoxy-benzyloxy-carbonyl azidation of insulin (pMZ) (formation of pMZ-insulin).

Step (3): Combining the fatty acid activated ester and the pMZ-insulin.

Step (4): Removal of the pMZ group.

Step (5): Separation and purification; storage.

The above steps can be described further as follows.

In step (1), synthesis of an activated ester is conducted in order to activate and increase the reactivity of the carboxyl group, since the fatty acid itself is not reactive and cannot as such bind to insulin. One specific example is N-hydroxy-succinimide ester.

In step (2), the p-methoxy-benzyloxy-carbonyl azidation of insulin is conducted in order to protect the amino groups, since the activity of insulin itself is lowered by the substitution of amino groups in the amino acids (Gly.) in the A chain, particularly A.

...  
solvent with stirring at room temperature



In step (4), the protecting group pMZ introduced in step (2) is released with trifluoroacetic acid.

In step (5), purification by gel filtration is followed by high-performance liquid chromatography to obtain insulin with a fatty acid bound to the amino group of one of the amino acids B<sub>1</sub> and B<sub>29</sub> (insulin with fatty acid bound to B<sub>1</sub> [original: R<sub>1</sub>] or B<sub>29</sub> [original: R<sub>29</sub>], and insulin with fatty acids bound to the amino groups of the amino acids B<sub>1</sub> and B<sub>29</sub> (insulin with fatty acid bound to B<sub>1</sub> [original: R<sub>1</sub>] and B<sub>29</sub> [original: R<sub>29</sub>])).

The resulting insulin derivative can be twice freeze dried and obtained as a powder.

### **Working examples and test examples**

Below the invention will be described by way of examples, but the invention is not restricted to these.

#### **Reference example 1**

##### **Method for preparing fatty acid activated ester**

50 mM palmitic acid and N-hydroxy-succinimide are added to 150 ml of ethyl acetate, 50 mM dicyclohexyl-carbodiimide is added while cooling with ice, and stirring is continued for 24 hours. After the end of reaction, the liquid is filtered, the solvent is distilled off, and the residue is recrystallized in ethanol to obtain palmitic acid N-hydroxy-succinimide ester.

#### **Reference example 2**

##### **Method for preparing pMZ-insulin**

1 mM bovine insulin and 4 mM p-methoxy-benzoyl azide are dissolved in 1 N sodium hydrogen carbonate solution - water - dimethyl-formamide (2:3:4), and is stirred for 34 hours at room temperature. After the end of the reaction, 50 % acetic acid is added, and solvent is distilled off. The residue is dried with a vacuum oven.

**Working example**

1 mM pMZ-insulin is dissolved in dimethyl-formamide, 50 mM palmitic acid N-hydroxy-succinimide ester is added to this, and it is stirred for 3 hours at room temperature. After the end of the reaction, solvent is distilled off, anisole and trifluoro-acetic acid are added to the residue, and it is stirred for 1 hour with ice cooling.

After that, trifluoro-acetic acid was distilled off, ether was added to the residue, the formed precipitate was filtered off, and the residue was rinsed with ether.

The resulting residue was dissolved in 1 N acetic acid, gel filtration was conducted on a column loaded with Sephadex G-25, and the insulin fraction was concentrated.

The insulin fraction was freeze dried, dissolved in a mixture of acetonitrile : 0.3 % trifluoro-acetic acid (2:3), whereafter Lys-B<sub>29</sub> palmitoyl-insulin (pal-1), Phe-B<sub>1</sub> palmitoyl-insulin (pal-2) and Phe-B<sub>1</sub> - Lys-B<sub>29</sub> dipalmitoyl-insulin (pal-3) were obtained by high-performance liquid chromatography.

The results of high-performance liquid chromatography are shown in Figure 1.

Identification of the positions where fatty acids are bound in the derivatives obtained as described above, was done by deaminating the derivative, hydrolyzing with acid to break all peptide bonds and hydrolyze into 51 amino acids, and analyzing with an amino acid analyzer.

The values from the amino acid analysis are shown in Table 1. As shown in the Table, insulin (unmodified) has 3 free amino groups, and when it is deaminated an amino group is lost and cannot be analyzed by amino acid analyzer, but when fatty acid is attached it cannot be deaminated, so when comparing insulin itself and the deaminated product, there will be an increase of one at the position where the fatty acid is attached, so position of the attachment can be identified.

Table 1. Values of amino acid analysis

	Insulin			Deaminated pal-insulin		
	Calculated value	Unmodified product	Deaminated product	pal-1	pal-2	pal-3
sp	3	2.93	3.03	3.47	3.12	3.05
ar	1	0.94	0.96	0.97	1.00	1.00
ar	3	2.54	2.71	3.05	2.80	2.71
u	7	7.32	7.5	8.25	7.39	7.49
o	1	1.15	1.23	1.00	1.09	1.09
y	4	4.05	3.36	3.28	3.26	3.26
3	3	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
s	3	2.38	2.4	-	0.94	1.73
il	5	3.3	3.7	4.87	4.19	4.04
t	1	0.31	0.28	0.62	0.53	0.55
u	6	5.42	5.56	6.47	5.81	5.67
r	4	3.91	1.65	-	2.77	2.90
e	3	2.58	2.21	2.94	2.83	2.21
s	1	0.95	0.09	0.05	0.69	0.79
s	2	1.96	1.93	2.09	1.94	2.01
i	1	1.1	1.09	1.92	1.89	1.51

\* Diagnostic amino acid

**Test Example (Blood sugar lowering effect)**

24 male Wistar rats after 24 hours fasting were fixed on the backside, the pharmaceutical to be tested was dissolved or dispersed in 1 N hydrochloric acid and was injected into the femoral vein or the femoral muscle. The amount administered was 100 µg/animal as insulin. After the administration, venous blood samples were taken and the amount of glucose in the blood was determined.

The results are shown in Figure 2.

As seen from the Figure, insulin derivatives pal-1 and pal-2 of this invention remarkably lowered the glucose value in the blood.

**4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 is a graph showing the results of a high-performance chromatogram.

Figure 2 is a graph showing the change in the glucose amount in blood after administration.

**Fig. 1**

Ordinate: Acetonitrile (%)

Abscissa: Time (min)

Symbols: INS (insulin)

**Fig. 2**

Ordinate: Glucose reduction in blood (%)

Abscissa: Time (hr)

Symbols: Reference (physiological saline)

pal-2

pal-1

Bovine insulin

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-254699

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成1年(1989)10月11日  
 C 07 K 7/40 8318-4H  
 A 61 K 37/26 ADP 8615-4C  
 // C 07 K 99:26 審査請求 未請求 請求項の数 5 (全5頁)

⑭ 発明の名称 インスリン誘導体及びその用途

⑯ 特 願 昭63-83912

⑰ 出 願 昭63(1988)4月5日

⑱ 発 明 者 村 西 昌 三 京都府京都市上京区烏丸通一条上ル西入ル観三橋町562番地19号

⑲ 発 明 者 木 曾 良 明 大阪府茨木市稲葉町15番地26号

⑳ 出 願 人 小 玉 株 式 会 社 東京都千代田区神田佐久間町3丁目2番地

㉑ 代 理 人 弁 理 士 尊 優 美 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

インスリン誘導体及びその用途

## 2. 特許請求の範囲

- (1) インスリンB鎖のB<sub>1</sub>又はB<sub>30</sub>のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合したインスリン。
- (2) インスリンB鎖のB<sub>1</sub>及びB<sub>30</sub>のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合したインスリン。
- (3) 請求項第1項記載の化合物の薬理的許容量を有効成分とする医薬組成物。
- (4) 請求項第2項記載の化合物の薬理的許容量を有効成分とする医薬組成物。
- (5) 糖尿病治療剤である請求項第3項及び第4項のいずれか1項記載の医薬組成物。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

インスリン誘導体に関するものである。

(従来技術)

インスリンは膵臓のランゲルハンス氏島より分泌されるアミノ酸残基51個からなるペプチドで、血液中のグルコース量の調節を行っているホルモンである。何らかの原因で膵臓からのインスリン分泌の調整に異常を来すと、高血糖症状となり糖尿病と診断される。糖尿病患者は、放置しておく、高血糖状態から種々の疾患を合併し死に到ることも多くない。従って、この高血糖状態を正常化させるために、インスリンを投与し改善する必要がある。投与されるインスリンとしては、ウシ、ブタの膵臓から抽出精製されたもの或は、大腸菌を遺伝子組み換えによりヒト型のものとしたもの又はブタインスリンを酵素化学的にヒト型に変換したものが用いられている。

のアミノ酸がアラニン及びバリンで、B-鎖30 (B<sub>30</sub>)がアラニンであるものがウシインスリンであり、B-鎖30のアミノ酸がアラニン、A-鎖8と10のアミノ酸がスレオニン及びイソロイシンよりなっているのがブタインスリンであり、A-鎖8、10のアミノ酸がスレオニン、イソロイシン、B-鎖30のアミノ酸がスレオニンよりなっているのがヒトインスリンである。

このようなヒト、ブタ又はウシインスリンを注射剤として患者に必要な量皮下又は筋肉に投与し、血糖を調整している。

糖尿病患者はこのインスリン注射を毎日、一生の間施行しなければならず、注射に伴う疼痛や注射部位の変性など肉体的苦痛ははなはだ大きいものがある。

このようなインスリン注射に伴う苦痛を除くため、経口投与や経鼻、直腸投与などの方法が研究されている。

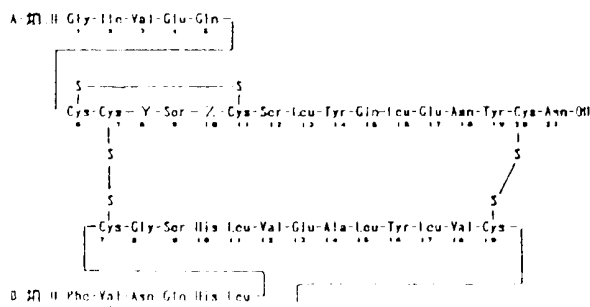
これらの方法は、何れも吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤等とインスリンとを製剤技術

ることを目的とするものである。

(課題を解決するための手段)

その結果、本発明者らは、インスリンの活性を失うことなく、血糖降下作用を示す、脂溶性インスリンとして新規な脂肪酸化インスリンを見出し本発明を完成させた。

本発明の新規なインスリン誘導体は、一般式 (I) :



的に調合したものである。これらの例を挙げると、酵素阻害剤と配合する方法 (ダンフォースら: *Endocrinology* 55, 175, 1978)、乳化剤により油性乳剤とする方法 (七里ら、*Acta Diabet. Lat.* 15, 175, 1978)、リボソームにする方法 (Yoshida: *EPA* 140,085)、又インスリン粒子をアゾポリマーで被覆し消化酵素の分泌されない大腸で放出させる方法がある (M. Saffran: *Canadian J. Biochem.*, 57, 548, 1979)。

又、経皮的持続注入用インスリンとしては、醗化インスリン (米国特許第 4478830号、第 4478746号、第 4483792号、第 4489063号、第 4489064号及び第 4536572号明細出) が知られている。このものは、従来のインスリン注射剤では結晶が析出し、長期保存に耐えないことから種々の醗化インスリンとしたものである。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、医薬として許容される安定なインスリン製剤に適するインスリン誘導体を提供す

(式中 R<sub>1</sub>、及び R<sub>2</sub> は同一又は異って脂肪酸基を表わし、X 及び Y は同一でスレオニン又はアラニンを表わし、Z は X 及び Y がスレオニンのときイソロイシンを表わし、X 及び Y がアラニンのときバリンを表わす。

又、式中 Phe: フェニルアラニン、Ile: イソロイシン、Val: バリン、Glu: グルタミン酸、Gln: グルタミン、Cys: システイン、Ser: セリン、Leu: ロイシン、Tyr: チロシン、Asn: アスパラギン、His: ヒスチジン、Gly: グリシン、Ala: アラニン、Arg: アルギニン、Thr: スレオニン、Pro: プロリン、を表わす。)

で表わされる。

本発明化合物は糖尿病における血糖降下剤として有用である。

以下、実施例を挙げる。

1. 脂肪酸を結合せしめたものである。

本発明においてインスリンは、ヒト、ブタ及びウシインスリンの何れも使用できる。

本発明において結合させる脂肪酸としては、炭素原子数 7~21前後のものが好ましく、例えばカプリル酸、ベラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、ヘプタデシル酸、ステアリン酸、ノナデカン酸、フラキン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、エライジン酸、セトレイン酸、エルカ酸、ブランジン酸、ソルビン酸、リノール酸、リノレイン酸が挙げられる。特に、パルミチン酸が好ましい。

本発明による化合物は、例えば以下のような方法で得ることができる。

工程(1):脂肪酸の活性化エステル合成

工程(2):インスリンのp-メトキシベンゾキシカルボニルアジド(p M Z)化(p M Z-インスリンの生成)

工程(3):脂肪酸活性エステルとp M Z-インス

リンとの結合

工程(4):p M Z基の除去

工程(5):分離精製・保存

上記各工程について説明すると次のとおりである。

工程(1)の活性化エステルの合成は、脂肪酸そのものでは反応性がなく、そのままではインスリンと結合しないため、脂肪酸のカルボキシル基を活性化させ反応性を高めるために行なう。一具体例としては、N-ヒドロキシサクシイミドエステルとする。

工程(2)のインスリンのp-メトキシベンゾキシカルボニルアジド化は、インスリンA鎖中のアミノ酸(Gly:)特にA<sub>1</sub>のアミノ基が脂肪酸によって置換されることにより、インスリンそのものの活性が低下することから、アミノ基の保護のためp M Z化を行なう。

工程(3)は工程(2)で得たp M Z-インスリンと工程(1)の活性脂肪酸エステルとの結

合反応で、この結合はジメチルホルムアミド溶液中で、室温にて攪拌することにより容易に進行する。

工程(4)で工程(2)において導入した保護基であるp M Zを、トリフルオロ酢酸により脱離させる。

工程(5)の精製はゲルろ過を行った後、高速液体クロマトグラフィーにより、インスリンB鎖のB<sub>1</sub>及びB<sub>29</sub>のいずれか一方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合せしめたもの(R<sub>1</sub>又はR<sub>29</sub>に脂肪酸が結合したインスリン)、B<sub>1</sub>及びB<sub>29</sub>の両方のアミノ酸のアミノ基に脂肪酸が結合せしめたもの(R<sub>1</sub>又はR<sub>29</sub>に脂肪酸が結合したインスリン)を得る。

得られたインスリン誘導体は、二次凍結乾燥し粉末として得ることができる。

(実施例及び試験例)

#### 参考例1 脂肪酸活性化エステルの製法

酢酸エチル 150ml にパルミチン酸及びN-ヒドロキシサクシイミド50mMを加えたのち、氷冷しながらジシクロヘキシルカルボジイミド50mMを加え24時間攪拌する。反応終了後、反応液をろ過し、溶媒を留去したのち、残渣をエタノールより再結晶し、パルミチン酸N-ヒドロキシサクシイミドエステルを得る。

#### 参考例2 p M Z化インスリンの製法

ウシインスリン1mM及びp-メトキシベンゾキシカルボニルアジド4mMを1N-炭酸水素ナトリウム溶液・水・ジメチルホルムアミド(2:3:4)の溶液に溶かし、室温で3時間攪拌する。反応終了後、50%酢酸を加え溶媒を留去する。残渣をエーテル及び1%酢酸で洗い、50%酢酸に溶かし凍結乾燥する。

p M Z-インスリン 1 m M をジメチルホルムアミドに溶かし、これにパルミチン酸 N-ヒドロキシサクシイミドエステル 50 m M を加え、室温で 3 時間攪拌する。反応後溶液を留去し、残液にアニソール及びトリフルオロ酢酸を加え氷浴下 1 時間攪拌する。

その後トリフルオロ酢酸を留去し、残液にエーテルを加え、生じた沈殿をろ過し、残渣をエーテルで洗浄した。

得られた残渣を 1 N 酢酸に溶解し、セファデックス-G 25 を充てんしたカラムによりゲルろ過を行いインスリン画分を濃縮した。

インスリン画分を凍結乾燥した後、アセトニトリル：0.3% トリフルオロ酢酸溶液（2：3）に溶かし、高速液体クロマトグラフィにより、Lys-B<sub>22</sub>、パルミトイルインスリン（pal-1）、Phe-B<sub>1</sub>、パルミトイルインスリン（pal-2）、Phe-B<sub>1</sub>-Lys-B<sub>22</sub>、ジパルミトイルインスリン（pal-3）を得た。

高速クロマトグラムの結果を第 1 図に示す。

第 1 表 アミノ酸分析値

試料編號	インスリン	未変性物	脱アミノ化合物			脱アミノ化 pal-1			脱アミノ化 pal-2			脱アミノ化 pal-3		
			3	1	7	pal-1	pal-2	pal-3	pal-1	pal-2	pal-3	pal-1	pal-2	pal-3
3	2.53		3.03	3.47	3.12	3.05								
1	0.94		0.96	0.97	1.00	1.00								
3	2.54		2.71	3.05	2.80	2.71								
7	7.32		7.5	8.25	7.39	7.49								
1	1.15		1.23	1.00	1.09	1.09								
4	4.05		3.36	3.28	3.26	3.26								
3	3.00		3.00	3.00	3.00	3.00								
3	2.38		2.4	-	0.94	1.73								
5	3.3		3.7	4.87	4.19	4.04								
1	0.31		0.28	0.52	0.53	0.55								
6	5.42		5.56	6.47	5.81	5.67								
4	3.91		1.65	-	2.77	2.90								
3	2.58		2.21	2.94	2.83	2.21								
1	0.95		0.09	0.05	0.69	0.79								
2	1.96		1.93	2.09	1.94	2.01								
1	1.1		1.09	1.92	1.89	1.51								

・ 脱アミノ化

す。

上記により得られたまたインスリン誘導体の脂肪酸結合部位の同定は、該誘導体の脱アミノ化を行なった後、酸分解し、すべてのペプチド結合を切断して 51 個のアミノ酸に分解した後、アミノ酸分析計により分析した。

アミノ酸分析値を第 1 表に示す。表に示すようにインスリン（未変性物）には遊離のアミノ基が 3 か所あり、これを脱アミノ化するとアミノ基が消失するためアミノ酸分析計で測定できないが、脂肪酸が結合していた場合脱アミノ化を受けないため、生インスリンと脱アミノ化物とを比較したとき脂肪酸が結合している部位のみ 1 つ多く出るため結合部位が同定できる。

#### 試験例（血糖降下作用）

ウイスター系雌性ラットを絶食 24 時間後、ペントバルビタール麻酔下背位に固定し、腹腔注射を 1 N-塩酸に溶解又は懸濁し、大動脈より静注又は大動脈に筋注した。投与量はインスリンとして 100  $\mu$ g/匹とした。投与後、頸動脈より採血し、血中グルコース量を測定した。

結果を第 2 図に示す。

図からわかるように、未発明のインスリン誘導体 Pal-1 及び 2 は、顕著に血中グルコース値を低下させる。

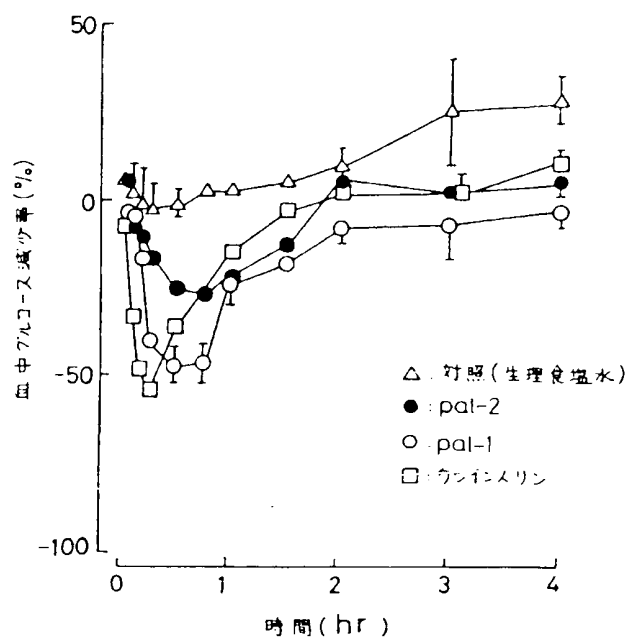
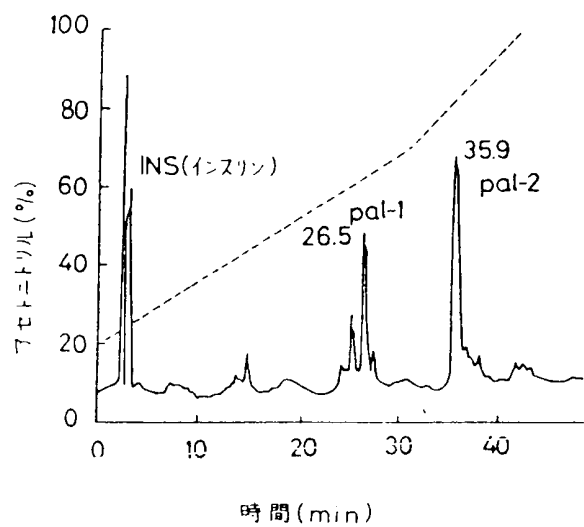
#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は高速液体クロマトグラムの結果を示すグラフ。



図 2

図 1



# DialogWeb

Guided Search

Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status JAPIO -Patent Abstracts of Japan. Derwent World Patents Index

Records for: **PN=JP 1254699**

Output

Format

Long

Output as

Browser

display/send

Modify

refine search

back to picklist

all none

Records 1-3 of 3 In long Format

☐ 1. 2/34/1 (Item 1 from file: 351)

008078156

WPI Acc No: 1989-343268/ 198947

Insulin derivs. useful as antidiabetic drugs - in which  
fatty acids are bonded to amino gps. of B1 and/or B29-amino-acids in  
B-chain of insulin

Patent Assignee: KODAMA KK (KODA-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	week
JP 1254699	A	19891011	JP 8883912	A	19880405	198947 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8883912 A 19880405

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 1254699	A	5		

Abstract (Basic): JP 1254699 A

Fatty acids are bonded to amino gps. of B1- and/or B29-amino acids  
in B chain of insulin. Drug compsns. as antidiabetic drug contain  
pharmacologically permitted amts. of the insulin derivs. as active  
components.

As insulin, any type of insulin (human, swine, bovine) can be used.  
As binding fatty acids, 7-21C fatty acids are pref., esp. palmitic  
acid. The synthetic processes are (i) synthesis for activated ester of  
fatty acid, (ii) formation of p-methoxybenzoxycarbonylazidated (pMZ)  
insulin (pMZ-insulin), (iii) bonding of activated ester of fatty acid  
and pMZ-insulin, (iv) removal of pMZ group, and (v) sepn., purificn.,  
and preservation.

USE/ADVANTAGE - The insulin derivs. have hypoglycaemic effect, esp.  
deaminated pal-insulin (pal-1, pal-2) are effective. They are useful as  
antidiabetic drugs.

0/0

Derwent Class: B04

International Patent Class (Additional): A61K-037/26; C07K-007/40;  
C07K-099/26

Derwent WPI (Dialog\* File 351) (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

☐ 2. 2/34/2 (Item 2 from file: 347)

02957099 \*\*Image available\*\*

Pub. No.: 01-254699 [JP 1254699 A]

Published: October 11, 1989 (19891011)

Inventor: MURANISHI SHOZO

KISO YOSHIKI

Applicant: KODAMA KK [404837] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 63-083912 [JP 8883912]

Filed: April 05, 1988 (19880405)

International Class: [ 4 ] C07K-007/40; A61K-037/26; C07K-099/26

JAPIO Class: 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.4 (ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine)

JAPIO Keyword: R059 (MACHINERY -- Freeze Drying)

Journal: Section: C, Section No. 673, Vol. 14, No. 7, Pg. 94, January 10, 1989 (19890110)

#### ABSTRACT

NEW MATERIAL: An insulin derivative having a fatty acid linked to amino group of an amino acid of B(sub 1) or B(sub 29) in insulin B chain expressed by the formula (R(sub 1) and R(sub 2) are fatty acid group; X and Y are threonine or alanine; Z is isoleucine or valine).

USE: A hypoglycemic agent, excellent in stability, having fat solubility and useful for diabetes.

PREPARATION: For example, a fatty acid (e.g., palmitic acid) is reacted with N-hydroxysuccinimide in a solvent to provide a fatty acid N-hydroxysuccinimide ester, which is then mixed with a solution of p-methoxycarbodiimidated bovine insulin and reacted at ambient temperature for 3hr. After completing the reaction, the solvent is distilled away and trifluoroacetic acid is added to the residue and reacted while being cooled with ice. The trifluoroacetic acid is then distilled off to dissolve the residue in 1 N acetic acid and carry out purification by gel filtration and high-speed chromatography, etc., to afford the aimed compound expressed by the formula.

3. 2/34/3 (Item 3 from file: 345)

8947613

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 1254699 A2 891011

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 1254699 A2 891011

INSULIN DERIVATIVE AND USE THEREOF (English)

Patent Assignee: KODAMA KK

Author (Inventor): MURANISHI SHOZO; KISO YOSHIKI

Priority (No,Kind,Date): JP 8883912 A 880405

Applic (No,Kind,Date): JP 8883912 A 880405

IPC: \* C07K-007/40; A61K-037/26; C07K-099-26

CA Abstract No: ; 112(23)217548A

Derwent WPI Acc No: ; C 89-343268

JAPIO Reference No: ; 140007C000094

Language of Document: Japanese

Inpadoc Fam.& Legal Stat (Dialog\* File 345): (c) 2003 EPO. All rights reserved.

all none

Records 1-3 of 3 In long Format

Output

Format

Long

Output as

Browser

display/send

Modify

refine search

back to picklist